

硝基咪唑类 (Metronidazole) ELISA 检测

试剂盒说明书

一、概要

本试剂盒是应用 ELISA 技术研发的新一代药物残留检测产品,与仪器分析技术相比具有快速、简便、准确和灵敏度高特点,操作时间仅需 2 小时,能最大限度地减少操作误差和工作强度。

二、试验原理

本试剂盒采用间接竞争 ELISA 方法,在酶标板微孔条上预包被偶联抗原,样本中残留的甲硝唑和微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗甲硝唑抗体,加入酶标二抗后,用 TMB 底物显色,样本吸光值与其残留物甲硝唑的含量成负相关,与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数,即可得出样品中甲硝唑的含量。

三、适用范围

可定性、定量检测蜂蜜样本中甲硝唑的残留量。

四、交叉反应率

甲硝唑	100%
二甲硝咪唑	91%
替硝唑	99%
洛硝唑	62%
异丙硝唑	33%

五、使用单位需自备的设备与试剂

设备:

- 微孔板酶标仪 450nm/630nm
- 旋转蒸发器/氮气吹干装置
- 振荡器
- 涡旋仪
- 离心机
- 天平:感量 0.01g
- 刻度移液管: 10ml
- 洗耳球
- 容量瓶: 100ml、500ml
- 玻璃试管: 10ml
- 聚苯乙烯离心管: 50ml
- 微量移液器: 单道 20 μ l~200 μ l、100 μ l~1000 μ l
多道 300 μ l

试剂:

- 乙酸乙酯(分析纯)
- 正己烷(分析纯)
- 去离子水
- 氢氧化钠

六、提料与试剂

北京祥龙环宇生物技术有限公司

电话: 010-65567512 传真: 010-85763341 email: huanyu1979@126.com info@bioxlhy.com 网址: www.bioxlhy.com

1、96 孔酶标板×1 块 (包被有偶联抗原)

2、标准液×6 瓶: (1ml/瓶)

0ppb, 0.1ppb, 0.3ppb, 0.9ppb, 2.7ppb, 8.1ppb

3、高浓度标准品: (1ml/瓶) **100ppb**

4、酶标二抗 12ml 红色帽

5、抗体工作液 7ml 绿色帽

6、底物液 A 液 7ml 白色帽

7、底物液 B 液 7ml 红色帽

8、终止液 7ml 黄色帽

9、20×浓缩洗涤液 40ml 透明帽

10、复溶工作液 50ml 蓝色帽

七、溶液的配制

配液 1: 0.3M 氢氧化钠溶液

称取 6.0g 氢氧化钠加去离子水溶解定容至 500ml。

配液 2: 乙酸乙酯-正己烷

量取 70ml 乙酸乙酯,加入 30ml 正己烷,混匀。

配液 3: 洗涤工作液

用去离子水将 20×浓缩洗涤液按 1: 19 体积比进行稀释(1 份 20×浓缩洗涤液+19 份去离子水)用于酶标板的洗涤,洗涤工作液在 4℃环境可保存一个月。

八、样本前处理步骤

样本处理前须知

处理任何样本时,都必须注意:

(a) 实验中必须使用一次性吸头,在吸取不同的试剂时要更换吸头。

(b) 实验之前须检查各种实验器具是否洁净,必须使用洁净实验器具,以避免污染干扰实验结果。

蜂蜜样本的前处理方法:

----称取 5.0±0.05g 蜂蜜至 50ml 聚苯乙烯离心管中;

----加入 10ml 乙酸乙酯-正己烷,再加入 8ml 0.3M 氢氧化钠溶液,用振荡器振荡至蜂蜜全部溶解;

----3000g 以上,室温(20-25℃)离心 5min;

----移取 5ml 上层有机相至 10ml 干净的玻璃试管中,于 50℃水浴中氮气流下吹干;

----加入 0.5ml 复溶工作液,涡动 30S,加入 1ml 正己烷,涡动 30S,3000g 以上,室温(20-25℃)离心 10min;

----除去上层有机相,取下层水相 50 μ l 用于分析。

九、检测步骤

测定前应须知:

1、使用之前将所有试剂和需用板条的温度回升至室温

(20-25℃)。(注：抗体工作液置于 4℃冰箱保存，点样时取出立即点样)

- 2、使用之后立即将所有试剂放回 2-8℃。
- 3、在 ELISA 分析中的再现性，很大程度上取决于洗板的一致性，正确的洗板操作是 ELISA 测定程序中的要点。
- 4、在所有恒温孵育过程中，避免光线照射，用盖板膜封住微孔板。

操作步骤：

- 1、将所需试剂从冷藏环境中取出，置于室温（20-25℃）平衡 30min 以上（注：抗体工作液置于 4℃冰箱保存，点样时取出立即点样），注意每种液体试剂使用前均须摇匀。
- 2、取出需要数量的微孔板，将不用的微孔放入自封袋，保存于 2-8℃。
- 3、洗涤工作液在使用前也需回温。
- 4、**编号：**将样本和标准品对应微孔按序编号，每个样本和标准品做 2 孔平行，并记录标准孔和样本孔所在的位置。
- 5、**加标准品/样本：**加标准品/样本 50μl 到对应的微孔中，再加入抗体工作液 50μl/孔（注：抗体工作液置于 4℃冰箱保存，点样时取出立即点样），轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置 0-4℃避光环境中反应 60min（如在暗处反应可不加盖板膜）。
- 6、**洗板：**小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液 250μl/孔，充分洗涤 4-5 次，每次间隔 10s，用吸水纸拍干（拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破）。
- 7、**加酶标二抗：**加入酶标二抗 100μl/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置 25℃避光环境中反应 30min，取出重复洗板步骤 6。
- 8、**显色：**加入底物液 A 液 50μl/孔，再加底物液 B 液 50μl/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置 25℃避光环境反应 30min（见注意事项 8）。
- 9、**测定：**加入终止液 50μl/孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于 450nm 处（建议用双波长 450/630nm 检测，请在 5min 内读完数据），测定每孔 OD 值。（若无酶标仪，则不加终止液用目测法可进行判定）。

十、结果判定

结果判定有两种方法，粗略判定可用第 1 种方法，而定量判定用第 2 种方法。注意样本吸光值与其所含甲硝唑成负相关。

- 1、用样本的平均吸光度值与标准值比较即可得出其浓度范围(ppb)。假设样本 1 的吸光度值为 0.410，样本 2 的吸光度值为 1.152，标准液吸光度值分别是：0ppb 为 1.860；0.1ppb 为 1.401；0.3ppb 为 1.085；0.9ppb 为 0.721；2.7ppb 为 0.431；8.1ppb 为 0.203。则样本 1 的浓度范围是 2.7ppb-8.1ppb 再乘以其对应的稀释倍数即可得出样本中甲硝唑残留的浓度范

围；样本 2 的浓度范围是 0.1 ppb-0.3ppb 再乘以其对应的稀释倍数即可得出样本中甲硝唑残留的浓度范围。

2、定量分析

(1) 百分吸光率的计算，标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的百分吸光度值的平均值（双孔）除以第一个标准（0 标准）的吸光度值，再乘以 100%，即

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\%$$

B—标准溶液或样本溶液的平均吸光度值

B₀—0(ppb)标准溶液的平均吸光度值

(2) 标准曲线的绘制与计算

以标准品百分吸光率为纵坐标，以甲硝唑标准品浓度（ppb）的半对数为横坐标，绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中甲硝唑实际残留量。

若利用试剂盒专业分析软件进行计算，更便于大量样本的准确、快速分析。（欢迎来电索取）

样本的稀释倍数：0.2

十一、检测方法灵敏度、准确度、精密度

试剂盒灵敏度：0.1ppb

样本最低检测限：

蜂蜜.....0.2ppb

准确度：

蜂蜜 80±15%

精密度：

试剂盒的变异系数均小于 10%

十二、注意事项

- 1、室温低于 20℃或试剂及样本没有回到室温（20-25℃）会导致所有标准的 OD 值偏低，抗体工作液回温到室温后点样可能会导致 OD 值偏高，抑制变差，因此抗体工作液置于 4℃冰箱保存，不需回温，点样时取出立即点样。
- 2、在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况，则会出现标准曲线不成线性，重复性不好的现象。所以洗板拍干后应立即进行下一步操作。
- 3、每加一种试剂前需将其摇匀。
- 4、反应终止液为 2M 硫酸，避免接触皮肤。
- 5、不要使用过了有效日期的试剂盒；也不要使用过了有效期的试剂盒中的任何试剂，掺杂使用过了有效期的试剂盒会引起灵敏度的降低；不要交换使用不同批号试剂盒中的试剂。
- 6、储存条件
保存试剂盒于 2-8℃，不要冷冻，将不用的酶标板微孔板放进自封袋重新密封。标准物质和无色的发色剂对光敏感，因此要避免直接暴露在光线下。
- 7、试剂变质的迹象发色试剂有任何颜色表明发色剂变质，

应当弃之。0 标准的吸光度（450/630nm）值小于 0.5（ $A_{450nm} < 0.5$ ）时，表示试剂可能变质。

8、在加入底物液 A 液和底物液 B 液后，一般显色时间为 20-30min 即可。若颜色较浅，可延长反应时间到 35min

（或更长），但不得超过 40min。反之，则减短反应时间。

十三、贮藏条件及保存期

贮藏条件：保存试剂盒于 2~8℃。

保存期：该产品有效期为 12 个月

